

# Utvrdjivanje prisustva stafilokoknih enterotoksina u namirnicama animalnog porekla ELISA testom

Lakićević Brankica<sup>1</sup>, Janković Vesna<sup>1</sup>, Spirić Danka<sup>1</sup>, Matekalo-Sverak Vesna<sup>1</sup>, Mitrović Radmila<sup>1</sup>, Borović Branka<sup>1</sup>, Baltić Tatjana<sup>1</sup>

*S a d r Ź a j:* Mnoge namirnice animalnog porekla predstavljaju odličan supstrat za rast *Staphylococcus aureus* i produkciju stafilokoknih enterotoksina (SE). Kontaminacija namirnica animalnog porekla (mleko i meso) enterotoksigenim sojevima koagulaza pozitivnih stafilokoka, tokom proizvodnog ciklusa dovodi do moguće produkcije SE i pojave alimentarnih intoksikacija, usled konzumiranja kontaminiranog finalnog proizvoda. U cilju objektivne procene potencijalnog mikrobiološkog rizika neophodna je adekvatna kontrola namirnica animalnog porekla na prisustvo *S. aureus* i stafilokoknih enterotoksina. Za određivanje broja koagulaza pozitivnih stafilokoka, korišćena je metoda SRPS EN ISO 6888-1, a za određivanje prisustva stafilokoknog enterotoksina, korišćen je ELISA kit Transia. Od ukupnog broja ispitanih uzoraka proizvoda od mleka (15), u dva uzorka sira i dva uzorka sladoleda utvrđeno je prisustvo koagulaza pozitivnih stafilokoka, u opsegu od  $2,07 \pm 0,06$  do  $6,78 \pm 0,13 \log_{10} \text{cfu/g}$ . Od deset ispitanih uzoraka mesa, u tri uzorka je utvrđen broj koagulaza pozitivnih stafilokoka u opsegu od  $2,60 \pm 0,11$  do  $3,38 \pm 0,14 \log_{10} \text{cfu/g}$ . Prisustvo stafilokoknih enterotoksina, ELISA metodom, utvrđeno je samo u uzorku sladoleda, koji je sadržao  $2,39 \pm 0,03 \log_{10} \text{cfu/g}$  *S. aureus*, u količini 1,56 ng/g.

**Ključne reči:** proizvodi od mleka, meso, koagulaza pozitivne stafilokoke, stafilokokni enterotoksini, ELISA.

## Uvod

Stafilokoke su ubikvitarni mikroorganizmi, a čovek i životinje osnovni izvori, odakle oni, vrlo lako, dospevaju u meso i druge namirnice. Meso, može biti kontaminirano stafilokokama koje mogu opstati, ali je njihov rast vrlo slabog intenziteta i ovakav vid prisutnosti koagulaza pozitivnih stafilokoka retko može dovesti do alimentarnih intoksikacija. Jedan od problema koji stvaraju stafilokoke jeste prisustvo meticilin rezistentnih sojeva. Ovi sojevi *Staphylococcus aureus* su dobro poznati kao vodeći uzroci trovanja hranom širom sveta. Njihov značaj, sa stanovišta bezbednosti hrane, proizilazi iz njihove sposobnosti da, u prehrambenim proizvodima formiraju stafilokokne enterotoksine (SE), koji se još nazivaju superantigenima i superantigenima koji su slični enterotoksinima (SEI), (Fetsch i dr., 2011). Problem predstavljaju uzorci šunke, gde je prisustvo patogena rezultat naknadne procesne kontaminacije, kao i fermentisane kobasice koje u proizvodnom ciklusu nemaju fazu termičke obrade (Bergdoll i dr., 2006).

Uzročnici intoksikacija uzrokovanih stafilokoknim enterotoksinima najčešće se mogu naći u sledećim namirnicama: pekarski proizvodi punjeni kremom i proizvodi od mesa, riba i proizvodi od ribe, sirovo mleko i proizvodi od mleka, salate, pite i sladoledi (Bennet i Monday, 2003).

Sirovo mleko, kao jedna od osnovnih namirnica, mora da bude zdravstveno bezbedno, jer u suprotnom ugrožava zdravlje ljudi. Sadržaj nutritivnih sastojaka mleka, pH vrednost od 6,6 i temperatura vimena od 38°C predstavljaju idealne uslove za rast bakterija. Dominantnu mikrofloru sirovog mleka koja potiče od zdravog vimena čine bakterije koje pripadaju rodovima *Micrococcus*, *Streptococcus* i *Corynebacterium*. Ukoliko dođe do pojave mastitisa, u relativno velikom broju mogu se naći *Streptococcus agalactiae*, *Staphylococcus aureus* i koliformne bakterije. Poslednjih deset godina, *S. aureus* je najčešće izolovani uzročnik supkliničkog i kliničkog mastitisa muznih životinja, koji može, u akutnoj formi, da izazove teške, maligne, mastitise u vidu granulomatoznih i nekrotičnih promena (Vakanjac i dr., 2008). Proizvodi od

**Napomena:** Prezentovani rezultati proistekli su iz rada na realizaciji Projekta TR III 46009 koji, u okviru Programa istraživanja u oblasti tehnološkog razvoja, finansira Ministarstvo prosvete i nauke Republike Srbije.

<sup>1</sup>Institut za higijenu i tehnologiju mesa, Kačanskog 13, 11000 Beograd, Republika Srbija.

mleka, a naročito nepasterizovani sirevi predstavljaju odličnu podlogu za rast *S. aureus*. Ovom patogenom bakterijom sir može da se kontaminira tokom proizvodnog ciklusa, ili naknadno (*Samaržija i dr.*, 2007).

Meso i proizvodi od mesa se, takođe, mogu kontaminirati bakterijom *S. aureus*. Izvor kontaminacije može biti sam čovek, životinja, ili okolina (*Tasci i dr.*, 2011). *Staphylococcus aureus* se smatra jednim od glavnih uzročnika oboljenja kod ljudi i životinja, kao što su invazivne infekcije, alimentarne intoksikacije i kombinacije pomenutih oboljenja (*Bergdoll i Lee Wong*, 2006).

Kada su alimentarne intoksikacije u pitanju, utvrđeno je da nastaju od 30 min do 8 h nakon konzumiranja kontaminirane namirnice. U odnosu na ostale patogene bakterije, infektivan broj *S. aureus*, neophodan za nastanak bolesti, relativno je visok i iznosi  $10^5$  cfu/mL(g). Razlog tome je činjenica da uzročnik bolesti nije vegetativno telo bakterije, već enterotoksini koje ona stvara (*Lindquist i dr.*, 2002). Veliki broj sojeva *S. aureus* proizvodi ekstraselularne termostabilne stafilocokne enterotoksine, koji svoju biološku aktivnost zadržavaju i nakon termičke obrade (*Fox i dr.*, 2000). Direktnu opasnost po ljudsko zdravlje predstavlja termorezistentnost stafilocoknih enterotoksina i otpornost na većinu proteolitičkih enzima, kao što su tripsin i pepsin, što omogućava njihov prolazak, u netaknutoj formi, kroz digestivni trakt (*Bennett*, 2001). Na osnovu epidemioloških studija, utvrđeno je da infektivna doza stafilocoknih enterotoksina za čoveka iznosi od  $<1$   $\mu$ g do 40  $\mu$ g (*Ikeada i dr.*, 2005).

Svi stafilocokni enterotoksini su proteini relativno male molekulske mase, od 26,9 do 29,6 kDa. Stafilocokni enterotoksini obuhvataju pet glavnih tipova enterotoksina: A, B, C, D i E (SEA – SEE) i odgovorni su za 95% svih stafilocoknih trovanja (*Bergdoll i Lee Wong*, 2006). Do danas je identifikovano i opisano 20 vrsta stafilocoknih enterotoksina: SEA–SEE, SEG–SER i SEU (*Jorgensen i dr.*, 2005; *Hennekinne i dr.*, 2006). U zavisnosti od pH, SEC se svrstava u 3 podgrupe – SEC1, SEC2 i SEC3 (*Kérouanton i dr.*, 2007). Uslovi u kojima ćelija stvara enterotoksine ( $a_w$  vrednost, temperatura, pH, prisustvo ili odsustvo kiseonika) razlikuju se od uslova rasta vegetativne ćelije. *S. aureus* se uništava zagrevanjem hrane na 66°C tokom 12 minuta, ali uništavanje njihovog toksina zahteva zagrevanje na 131°C tokom 30 minuta (*Samaržija*, 2007).

Regulative o mikrobiološkim kriterijumima za hranu, (EC) 2073/2005, (EC) 1441/2007, (EU) 365/2010, Zakon o bezbednosti hrane (*Sl. Glasnik*

RS, 41/2009) i Pravilnik o opštim i posebnim uslovima higijene hrane u bilo kojoj fazi proizvodnje, prerade i prometa (*Sl. glasnik RS* 72/10) daju pregled odgovarajućih kriterijuma i pravila o bezbednosti hrane, uključujući koagulaza pozitivne stafilokoke i stafilocokne enterotoksine. Zbog objektivne procene potencijalnog mikrobiološkog rizika neophodna je adekvatna kontrola namirnica animalnog porekla na prisustvo *S. aureus* i stafilocoknih enterotoksina, što ujedno predstavlja i cilj ovog rada.

## Materijal i metode

Metodom za određivanje broja koagulaza pozitivnih stafilokoka ispitano je ukupno 25 uzoraka, i to 15 uzoraka proizvoda od mleka (sirevi domaće proizvodnje,  $n = 5$ ; jogurt,  $n = 5$  i sladoled,  $n = 5$ ) i 10 uzoraka mesa. Na prisustvo stafilocoknih enterotoksina, ispitani su samo uzorci u kojima su utvrđene stafilokoke.

## Mikrobiološka ispitivanja

Koagulaza pozitivne stafilokoke ispitane su metodom SRPS EN ISO 6888-1. Po 0,1 mL suspenzije odgovarajućeg decimalnog razređenja uzorka zasejano je na po dve Petri ploče sa Baird Parker podlogom (*Baird-Parker*, 1962). Ploče su inkubirane 24h  $\pm$  2h na 37°C. Ispitivanja su obavljena u tri ponavljanja.

## Detekcija stafilocoknih enterotoksina

Za detekciju stafilocoknih enterotoksina korišćen je ELISA kit Transia (BioControl Systems Inc). Uzorci su pripremljeni u skladu sa uputstvom proizvođača. Princip Transia® ELISA kit zasniva se na sendvič tipu reakcije i omogućava detekciju 5 glavnih enterotoksina (A, B, C, D i E). Postupak koncentrovanja ekstrakta uzorka pomoću creva za dijalizu, omogućava dobijanje ekstrakta u kojem je koncentracija stafilocoknih enterotoksina i do deset puta veća od koncentracije analita u samom uzorku. Vrednosti apsorbanci očitane su na spektrofotometru Multiscan Ascent, na talasnoj dužini 450 nm. Limit detekcije metode je od 0,25 ng/ml. Za potvrđivanje stafilocoknog enterotoksina, korišćena je pozitivna kontrola reagensa iz kita i eksterni standard stafilocoknog enterotoksina A (S9399, Sigma – Aldrich). Ispitivanja su obavljena u duplikatu prema protokolu za kit Transia.

## Rezultati i diskusija

U tabeli 1 prikazani su rezultati ispitivanja prisustva koagulaza pozitivnih stafilokoka u proizvodima od mleka. Na osnovu rezultata prikazanih u tabeli 1 može da se konstatuje da je od ukupnog broja ispitanih proizvoda od mleka (15), u četiri uzorka (26,6%) utvrđeno prisustvo koagulaza pozitivnih stafilokoka. Od pet ispitanih uzoraka sira domaće proizvodnje, u dva (13,33%) je utvrđeno prisustvo *S. aureus*, i to u količini od  $2,07 \pm 0,06 \log_{10}\text{cfu/g/ml}$  (uzorak 4) i  $6,78 \pm 0,129 \log_{10}\text{cfu/g/ml}$  (uzorak 1).

**Tabela 1.** Ukupan broj koagulaza pozitivnih stafilokoka u proizvodima od mleka ( $\bar{X} \pm \text{Sd}$ ,  $\log_{10}\text{cfu/g/ml}$ )

**Table 1.** Total count of *S. aureus* in milk products ( $\bar{X} \pm \text{Sd}$ ,  $\log_{10}\text{cfu/g/ml}$ )

Broj uzorka / Sample number	Vrsta uzorka / Type of sample	<i>S. aureus</i> ( $\bar{X} \pm \text{Sd}$ ) $\log_{10}\text{cfu/g/ml}$
1	Sir/cheese	$6,78 \pm 0,129$
2	Sir/cheese	ND
3	Sir/cheese	ND
4	Sir/cheese	$2,07 \pm 0,06$
5	Sir/cheese	ND
6	Sladoled/ice cream	ND
7	Sladoled/ice cream	$5,64 \pm 0,08$
8	Sladoled/ice cream	$2,39 \pm 0,03$
9	Sladoled/ice cream	ND
10	Sladoled /ice cream	ND
11	Jogurt/yoghurt	ND
12	Jogurt/yoghurt	ND
13	Jogurt/yoghurt	ND
14	Jogurt/yoghurt	ND
15	Jogurt/yoghurt	ND

### Legenda/Legend:

Sd – standardna devijacija/standard deviation;  
ND – nije detektovan/not detected

Ispitivanja su pokazala da pet uzoraka sladoleda imaju istu procentualnu zastupljenost koagulaza pozitivnih stafilokoka u odnosu na broj ispitanih uzoraka kao i sir (13,33%), a utvrđene su

sledeće vrednosti:  $5,64 \pm 0,08 \log_{10}\text{cfu/g}$  (uzorak 7) i  $2,39 \pm 0,03 \log_{10}\text{cfu/g}$  (uzorak 8). Ni u jednom, od pet ispitanih uzoraka jogurta nije utvrđeno prisustvo koagulaza pozitivnih stafilokoka.

U tabeli 2 prikazani su rezultati ispitivanja prisustva koagulaza pozitivnih stafilokoka u uzorcima mesa. Na osnovu dobijenih rezultata za prisustvo koagulaza pozitivnih stafilokoka u mesu, može da se kaže da je u deset uzoraka mesa, *S. aureus* utvrđen u količini  $3,380 \pm 0,14 \log_{10}\text{cfu/g}$  (uzorak br. 16);  $2,62 \pm 0,09 \log_{10}\text{cfu/g}$  (uzorak br. 19) i  $2,60 \pm 0,11 \log_{10}\text{cfu/g}$  (uzorak br. 24).

**Tabela 2.** Broj koagulaza pozitivnih stafilokoka u uzorcima sirovog mesa ( $\bar{X} \pm \text{Sd}$ ,  $\log_{10}\text{cfu/g}$ )

**Table 2.** *S. aureus* in raw meat ( $\bar{X} \pm \text{Sd}$ ,  $\log_{10}\text{cfu/g}$ )

Broj uzorka / Sample number	<i>S. aureus</i> ( $\bar{X} \pm \text{Sd}$ ) $\log_{10}\text{cfu/g/ml}$
16	$3,380 \pm 0,14$
17	ND
18	ND
19	$2,62 \pm 0,09$
20	ND
21	ND
22	ND
23	ND
24	$2,60 \pm 0,11$
25	ND

### Legenda/Legend:

Sd – standardna devijacija/standard deviation;  
ND – nije detektovan/not detected

Uzorci u kojima su dokazane koagulaza pozitivne stafilokoke ispitani su na prisustvo stafilokoknog enterotoksina korišćenjem ELISA metode za detekciju stafilokoknih enterotoksina. U tabeli 3. prikazani su rezultati ispitivanja prisustva stafilokoknih enterotoksina ELISA metodom u sledećim sumnjivim uzorcima: 1, 4, 7, 8, 16, 19 i 24. Prisustvo stafilokoknih enterotoksina, od ispitivanih sedam, potvrđeno je u samo jednom uzorku (uzorak br. 8 – sladoled), u količini  $1,56 \text{ ng/g}$ .

**Tabela 3.** Prisustvo stafilokoknih enterotoksina (ng/ml)**Table 3.** Staphylococcal enterotoxins presence (ng/ml)

Uzorak/ Sample	Koncentracija/ Concentration (ng/ml)
1 Sir/cheese	ND
4 Sir/cheese	ND
7 Sladoled/ice cream	ND
8 Sladoled/ice cream	1,56
16 Sirovo mleko/ Raw milk	ND
19 Sirovo mleko/ Raw milk	ND
24 Sirovo mleko/ Raw milk	ND

**Legenda/Legend:** ND – nije detektovan/not detected

Od ukupno 25 ispitanih uzoraka, kod sedam (28%) je utvrđeno prisustvo koagulaza pozitivnih stafilokoka, dok je samo kod jednog uzorka sladoleda (4%) utvrđeno prisustvo enterotoksina i kao takav se smatra mikrobiološki neispravnim. Primenjene metode i interpretacija rezultata su u skladu sa Regulativom Evropske komisije 2073/2005 i Pravilnikom o opštim i posebnim uslovima higijene hrane u bilo kojoj fazi prerade i prometa (*Službeni glasnik RS*, broj 72/10).

Nekoliko imunoenzimskih metoda (RIA, ELISA, RPLA) koristi se za detekciju enterotoksina. Međutim, za rutinsku detekciju enterotoksina ELISA predstavlja najčešće korišćen metod, prevashodno zbog senzitivnosti i specifičnosti. U nekoliko studija opisano je korišćenje PCR za detekciju SE gena (*Becker i dr.*, 1998; *Mehrotra i dr.*, 2000; *Martin i dr.*, 2006).

Ispitivanje proizvoda od mleka na prisustvo koagulaza pozitivnih stafilokoka i enterotoksina, predmet su mnogih studija (*De Reu i dr.*, 2002; *Demirel i Karapinar*, 2004; *Normanno i dr.*, 2005; *Joffe i Baranovics*, 2006; *Samaržija*, 2007). Sirevi, kao i drugi proizvodi koji sadrže veliku količinu proteina, povoljan su medij za rast većine patogenih bakterija. Osim toga, ni jedna tehnologija proizvodnje sira ne može garantovati potpuno siguran proizvod (*Fox i dr.*, 2000). Međutim, prisutnost i preživljavanje *S. aureus* povezano je sa nizom faktora, kao što su početni broj bakterija, prisutnost drugih bakterijskih

vrsta, fiziološki status patogenih sojeva, koncentracija mlečne kiseline (pH), biohemijske promene tokom zrenja, vrsta i sastav sira i drugo (*Bachmann i Spahr*, 1995).

Nakon ispitivanja 30 uzoraka belog sira domaće proizvodnje, *Bostan i dr.* (2006), su ustanovili prisustvo *S. aureus* u opsegu od  $< 10$  do  $9,2 \times 10^1$  cfu/g, dok ELISA metodom nije utvrđeno prisustvo enterotoksina. *Sancak i dr.* (2006) ispitivali su 50 uzoraka sira, a broj *S. aureus* se kretao u rasponu od  $< 2$  do  $4,7 \log_{10}$  cfu/g, dok prisustvo enterotoksina u ovim uzorcima nije utvrđeno.

*Normano i dr.* (2005) su prijavili 23 (6,6%) pozitivna od 350 uzoraka sladoleda ispitanih na prisustvo koagulaza pozitivnih stafilokoka. Četiri ispitana uzorka bila su kontaminirana enterotoksinima (SEA i SEB). *Tasci i dr.* (2011) pratili su broj koagulaza pozitivnih stafilokoka i prisustvo enterotoksina u 50 uzoraka sladoleda. Ukupan broj koagulaza pozitivnih stafilokoka bio je, u proseku, oko  $3,00 \log_{10}$  cfu/g, dok prisustvo enterotoksina nije detektovano ELISA metodom. Naknadna kontaminacija sirovog mleka i proizvoda od mleka moguća je, i to, naročito, prilikom procesa proizvodnje, gde čovek može biti kliconoša, ili zbog samih uslova sredine. Ovakav vid kontaminacije predstavlja značajan rizik po zdravlje potrošača, tako da je neophodno obratiti pažnju na sve vidove bakteriološke kontaminacije mleka (*Tasci i dr.*, 2011).

*Atanassova i dr.* (2001) su, na osnovu (PCR) ispitivanja, utvrdili da je od 135 uzoraka 69 (51,1%) bilo pozitivno na prisustvo *S. aureus*, i to: sirovo svinjsko meso, 62,2%, soljeno meso, 55,6% i dimljena šunka 35,6%. Kada su u pitanju enterotoksini, korišćenjem prajmera za gene enterotoksina A i D, 24 od 135 uzoraka bilo je pozitivno. *Nipa i dr.* (2009) ispitivali su 155 uzoraka fermentisanih kobasica i utvrdili da je na prisustvo *S. aureus* bilo pozitivno 39,35% uzoraka, ali prisustvo enterotoksina nije utvrđeno.

## Zaključak

Od ukupnog broja ispitanih uzoraka, po pet uzoraka sira, sladoleda i jogurta, u dva uzorka sira i dva uzorka sladoleda, utvrđeno je prisustvo *S. aureus*. Od ispitanih deset uzoraka sirovog mesa utvrđeno je prisustvo koagulaza pozitivnih stafilokoka u tri uzorka. Od svih ispitanih uzoraka u kojima je ustanovljeno prisustvo *S. aureus*, prisustvo enterotoksina, ELISA metodom, ustanovljeno je samo u jednom ispitivanom uzorku sladoleda. Dobijeni rezultati ukazuju na neophodnost redovne toksikološke analize prisustva stafilokoknih enterotoksina u namirnicama animalnog porekla, u cilju zaštite potrošača.



## Literatura

- Atanassova V., Meindl A., Ring C., 2001.** Prevalence of *S. aureus* and staph. Enterotoxins in raw pork and uncooked smoked ham comparison of classical culturing detection and RFLP PCR. *International Journal of Food Microbiology*, 68, 105–113.
- Bachmann H. P., Spahr U., 1995.** The Fate of Potentially Pathogenic Bacteria in Swiss Hard and Senihard Cheeses Made from Raw Milk. *Journal of Dairy Science*, 78, 476–483.
- Baird-Parker A. C., 1962.** An improved diagnostic and selective medium for isolating coagulase-positive staphylococci. *Journal of Applied Bacteriology*, 25, 12–19.
- Becker K., Roth R., Peters G., 1998.** Rapid and specific detection of toxigenic *S. aureus*: use of two multiplex PCR enzyme immunoassays for amplification and hybridization of staphylococcal enterotoxin genes, exfoliative toxin genes and toxic shock syndrome toxin I gene. *Journal of Clinical Microbiology*, 36, 2548–2553.
- Bennett R. W., 2001.** *Staphylococcus aureus* in Ronald G. Labbe and Santos Garcia., *Guide To Foodborne Pathogens*, John Wiley and Sons, Inc, New York, NY, 201–220.
- Bennet R. W., Monday S. R., 2003.** *Staphylococcus aureus*, Chapter 4. In: *International Handbook of Foodborne Pathogens*. Miliots M. D, Bier J. W. (eds), Marcel Dekker, Inc., New York, 240–258.
- Bergdoll M. S., Lee Wong A. C., 2006.** Staphylococcal intoxications. In: Rieman, H.P., Cliver, D.O. (Eds.), *Foodborne Infections and Intoxications*. Academic Press, Elsevier Inc., San Diego, California, 523–562.
- Commission Regulation (EC) 2073/2005 of 15 November 2005 on microbiological criteria for foodstuffs, 2005.**
- Council Regulation (EEC) 2377/90, 1990.** Laying down a community procedure for the establishment of maximum residue limit of veterinary medicine products in foodstuffs of animal origin.
- De Reu K., Debeuckelaere W., Botteldoorn N., De Block J., Herman L., 2002.** Hygienic parameters, toxins and pathogen occurrence in raw milk cheeses. *Journal of Food Safety*, 22, 183–196.
- Demirel N., Karapinar M., 2004.** Incidence of *Staphylococcus aureus* and its enterotoxins in various cheeses sold at retail markets of Izmir city. *Academic Food Journal*. 10, 25–28.
- Fetsch A., Kraushaar B., Krause G., Guerra-Román B., Alt K., Hammerl J. A., Käsbohrer A., Braeunig J., Appel B., Tenhagen B. A., 2011.** Meticilin-rezistentni sojevi *Staphylococcus aureus*, od farme do trpeze – uticaj na bezbednost hrane. *Tehnologija mesa*, 52, 1, str. 60–65.
- Fox P. F., Guinne, T. P., Cogan T. M., McSweeney P. L. H., 2000.** Pathogens and Food-Poisoning Bacteria in Cheese. IN: *Fundamentals of Cheese Science*, An Aspen Publication, Aspen Publishers, Inc. Gaithersburg, Maryland, 484–501.
- Hennekinne A., Guiller F., Perelle S., DE Buyser M. L., Dragacci S., Kryš S., Lombard B., 2006.** Interlaboratory validation according to the EN ISO 16 140 Standards of the Vidas SET2 detection kit for use in official controls of staphylococcal enterotoxins in milk products. *Journal of Applied Microbiology*, 1–11.
- Ikeada T., Tamate N., Yamaguuchi K., Makino S., 2005.** Mass outbreaks of food poisoning disease caused by small amounts of staphylococcal enterotoxins A and H., *Applied and Environmental Microbiology*, 71, 2793–2795.
- Joffe R., Baranovics E., 2006.** Bovine mastitis as the primary contamination source of milk and milk products with *S. aureus* enterotoxins. *Veterinary Medicine and Zootechnics*, 36, 58, 21–26.
- Jorgensen H., Mork T., Rovik L. M., 2005.** The occurrence of *S. aureus* on Farm with Small Scale Production of Raw Milk Cheese. *Journal of Dairy Science*, 88, 3810–3817.
- Kérouanton A., Hennekinne A., Leterte C., Petit, L., Chesneau O., Brisbois A., DE Buyser M. L., 2007.** Characterization of *Staphylococcus aureus* strains associated with food poisoning outbreaks in France. *International Journal of Food Microbiology*, 23–37.
- Lindqvist R., Sylven S., Vagsholm I., 2002.** Quantitative microbial risk assessment exemplified by *Staphylococcus aureus* in unripened cheese made from raw milk. *International Journal of Food Microbiology*, 78, 155–170.
- Martin B., Garriga M., Hugas M., Bover Cid S., Veciana Nogues M. T., Aymerich T., 2006.** Molecular, technological and safety characterization of Gram positive catalase positive cocci from slightly fermented sausages. *International Journal of Food Microbiology*, 107, 148–158.
- Mehrotra M., Wang G., Johnson W. M., 2000.** Multiplex PCR for detection of genes for *Staphylococcus aureus* enterotoxins, exfoliative toxins, toxic shock syndrome toxin I and methicillin resistance. *Journal of Clinical Microbiology*, 38, 1032–1035.
- Nipa C., Sarinya P., Young-Gun Z., Sanit K., Plearnpis L., Srianant W., Valyasevic R., 2009.** Incidence of *Staphylococcus aureus* and associated risk factors in Nham, a Thai fermented pork product, *Food Microbiology* 26, 547–551.
- Normanno G., Firinu A., Virgilio S., Mula G., Dambrosio A., Poggiu A., Decastelli L., Mioni R., Scuota S., Bolzoni G., Di Giannatale E., Salinetti AP., La Salandra G., Bartoli M., Zuccon F., Pirino T., Sias S., Parisi A., Quaglia NC., Celano G. V., 2005.** Coagulase-positive *Staphylococci* and *Staphylococcus aureus* in food products marketed in Italy. *International Journal of Food Microbiology*, 98, 73–79.
- Pravilnik o opštim i posebnim uslovima hrane u bilo kojoj fazi proizvodnje, prerade i prometa 2010.** Službeni glasnik Republike Srbije, br. 72/10.
- Pravilnik o opštim i posebnim uslovima higijene hrane u bilo kojoj fazi prerade i prometa, 2010.** Službeni glasnik Republike Srbije, br. 72/10.
- Samaržija D., Damjanović S., Pogačić T., 2007.** *S. aureus* u siru, *Mljekarstvo*, 57, 1, 31–48.
- Sancak Y. C., Alisarli M., Akkaya L., 2006.** Otlu peynirlerde enterotoksijenik *Staphylococcus aureus* suşları ve enterotoksin varlığı uzerine bir arastirma. *Yüzüncü Yıl Üniversitesi Sağlık Bilimleri Dergisi*, 9, 1, 218–225.
- Tasci F., Sahindokuyucu F., Dilek O., 2011.** Detection of *Staphylococcus* species and staphylococcal enterotoxins by ELISA in ice cream and cheese consumed in Burdur Province. *African Journal of Agricultural Research*, 6, 4, 937–942.
- Vakanjac S., Pavlović M., Pavlović V., Obrenović S., 2008.** Imunoprofilaksa mastitisa krava izazvanog sa *Staphylococcus aureus*, *Acta Veterinaria*, 58, 2–3, 221–230.

## Detection of staphylococcal enterotoxins in foodstuffs of animal origin by ELISA method

Lakićević Brankica, Janković Vesna, Spirić Danka, Matekalo-Sverak Vesna, Mitrović Radmila, Borović Branka, Baltić Tatjana

*S u m m a r y:* Many foods of animal origin represent an excellent substrate for growth of *Staphylococcus aureus* and production of staphylococcal enterotoxins (SE). Contamination of food of animal origin (milk and meat) with enterotoxigenic strains of coagulase positive staphylococci during the production cycle can lead to production of SE and to the occurrence of foodborne intoxication, due to consumption of the contaminated final product. The objective assessment of potential microbiological risk requires an adequate control of food of animal origin for the presence of *S. aureus* and staphylococcal enterotoxin. To determine the number of coagulase positive staphylococci, the EN ISO 6888-1 method was applied. For determination of the presence of staphylococcal enterotoxin the ELISA kit Transia was used. Out of 15 investigated milk products, coagulase-positive staphylococci were determined in two cheese samples and two ice cream samples. Staphylococci strains ranged from  $2.07 \pm 0.06$  to  $6.78 \pm 0.13 \log_{10}$  cfu/g/ml. Out of ten tested meat samples, three samples contained coagulase positive staphylococci, ranging from  $2.60 \pm 0.11$  to  $3.38 \pm 0.14 \log_{10}$  cfu/g. The presence of staphylococcal enterotoxin was determined in one ice cream sample only, in the quantity of 1.56 ng/ml. This sample contained  $2.39 \pm 0.03 \log_{10}$  cfu/g/ml *S. aureus*.

**Key words:** dairy products, raw meat, *Staphylococcus aureus*, staphylococcal enterotoxins, ELISA.

Rad primljen: 2.11.2012.

Rad ispravljen: 27.02.2012.

Rad prihvaćen: 10.04.2012.